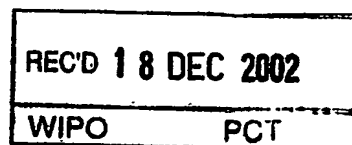




10/530165  
Rec'd PCT/PTO 04 APR 2005  
PCT/CH 02 00670

SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT  
CONFÉDÉRATION SUISSE  
SWISS CONFEDERATION



### Bescheinigung

Die beiliegenden Akten stimmen überein mit den ursprünglichen Unterlagen der auf den nächsten Seiten bezeichneten, beim unterzeichneten Amt, als Anmeldeamt im Sinne von Art. 10 des Vertrages über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens (PCT), eingegangenen Patentanmeldung.

### Attestation

Les documents ci-joints sont conformes aux pièces originales relative à la demande de brevet spécifiée aux pages suivantes, déposées auprès de l'Office soussigné, en tant qu'Office récepteur au sens de l'article 10 du Traité de coopération en matière de brevets (PCT).

### Confirmation

It is hereby confirmed that the attached documents are corresponding with the original pages of the international application, as identified on the following pages, filed under Article 10 of the Patent Cooperation Treaty (PCT) at the receiving office named below.

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Bern, 6. Dezember 2002

Eidgenössisches Institut für Geistiges Eigentum  
Institut Fédéral de la Propriété Intellectuelle  
Swiss Federal Intellectual Property Institute

Patentverfahren  
Administration des brevets  
Patent Administration

Rolf Hofstetter

# PCT

## Anmeldeamtsexemplar

### ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen	
<b>PCT/CH 02 / 00553</b>	
Internationales Aktenzeichen	
<b>04. Okt. 2002</b>	<b>(04. 10. 02)</b>
Internationales Anmeldedatum	
<b>RO / CH - Internationale Anmeldung PCT</b>	
Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"	
Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht) (max. 12 Zeichen) <b>P1090PCT</b>	

<b>Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG</b> Neue Substrate für TAFIa	
<b>Feld Nr. II ANMELDER</b> <input type="checkbox"/> Diese Person ist gleichzeitig Erfinder	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.) <b>Pentapharm AG</b> <b>Engelgasse 109</b> <b>CH-4052 Basel</b> <b>Schweiz</b>	Telefonnr.:  Telefaxnr.:  Fernschreibnr.:  Registrierungsnr. des Anmelders beim Amt:
Staatsangehörigkeit (Staat): <b>CH</b>	Sitz oder Wohnsitz (Staat): <b>CH</b>
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input checked="" type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten	
<b>Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER</b>	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.) <b>ZIEGLER, Hugo</b> <b>Im Bohnacker 15</b> <b>CH-4108 Witterswil</b> <b>Schweiz</b>	Diese Person ist: <input type="checkbox"/> nur Anmelder <input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder <input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.) Registrierungsnr. des Anmelders beim Amt:
Staatsangehörigkeit (Staat): <b>CH</b>	Sitz oder Wohnsitz (Staat): <b>CH</b>
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.	
<b>Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTELLANSCHRIFT</b>	
Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als: <input checked="" type="checkbox"/> Anwalt <input type="checkbox"/> gemeinsamer Vertreter	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.) <b>BRAUN, André</b> <b>Braun &amp; Partner</b> <b>Reussstrasse 22</b> <b>CH-4054 Basel</b> <b>Schweiz</b>	Telefonnr.: <b>+41 61 307 90 30</b> Telefaxnr.: <b>+41 61 307 90 39</b> Fernschreibnr.:  Registrierungsnr. des Anwalts beim Amt:
<input type="checkbox"/> Zustellanschrift: Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.	

## Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Wird keines der folgenden Felder benutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigelegt werden.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

STÜRZEBECHER, Jörg  
Hubertusstr. 38  
DE-99094 Erfurt  
Deutschland

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Registrierungsnr. des Anmelders beim Amt:

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

WIKSTROEM, Peter  
Obere Egg 3  
CH-5073 Gipf-Oberfrick  
Schweiz

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Registrierungsnr. des Anmelders beim Amt:

Staatsangehörigkeit (Staat):

SE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

CH

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

PRASA, Dagmar  
Backhausstr. 12  
DE-99094 Erfurt  
Deutschland

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Registrierungsnr. des Anmelders beim Amt:

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☐ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Registrierungsnr. des Anmelders beim Amt:

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.

**Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN** Bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden.

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen:

**Regionales Patent**

- ☒ **AP ARIPO-Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mosambik, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swasiland, TZ Vereinigte Republik Tansania, UG Uganda, ZM Sambia, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben) .....
- ☒ **EA Eurasisches Patent:** AM Armenien, AZ Aserbaidshan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ **EP Europäisches Patent:** AT Österreich, BE Belgien, CH & LI Schweiz und Liechtenstein, CY Zypern, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden, TR Türkei und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ **OA OAPI-Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, GQ Äquatorialguinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben) .....

**Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):**

- |  |  |  |
|--|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> AE Vereinigte Arabische Emirate        | <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia  | <input checked="" type="checkbox"/> NZ Neuseeland .....                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> AG Antigua und Barbuda                 | <input checked="" type="checkbox"/> HR Kroatien .....  | <input checked="" type="checkbox"/> OM Oman                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albanien .....                      | <input checked="" type="checkbox"/> HU Ungarn .....  | <input checked="" type="checkbox"/> PH Philippinen .....                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenien .....                      | <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesien .....                                      | <input checked="" type="checkbox"/> PL Polen .....                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Österreich + Gebrauchsmuster .....  | <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel .....  | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal .....                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australien .....                    | <input checked="" type="checkbox"/> IN Indien .....  | <input checked="" type="checkbox"/> RO Rumänien                          |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Aserbaidshan .....                  | <input checked="" type="checkbox"/> IS Island .....  | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russische Föderation .....        |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegovina .....           | <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan .....   |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados .....                      | <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenia .....   | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan                             |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgarien .....                     | <input checked="" type="checkbox"/> KG Kirgisistan .....                                     | <input checked="" type="checkbox"/> SE Schweden                          |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brasilien .....                     | <input checked="" type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea .....               | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapur                          |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus .....                       | <input checked="" type="checkbox"/> KR Republik Korea .....                                  | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slowenien .....                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> BZ Belize .....                        | <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kasachstan .....                                      | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slowakei + Gebrauchsmuster .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada .....                        | <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia .....                                     | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone .....                |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH & LI Schweiz und Liechtenstein      | <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka .....                                       | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tadschikistan .....               |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China .....                         | <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia .....   | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan .....                |
| <input checked="" type="checkbox"/> CO Kolumbien .....                     | <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho .....   | <input checked="" type="checkbox"/> TN Tunesien                          |
| <input checked="" type="checkbox"/> CR Costa Rica .....                    | <input checked="" type="checkbox"/> LT Litauen .....   | <input checked="" type="checkbox"/> TR Türkei .....                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Kuba .....                          | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxemburg .....                                       | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago .....         |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik + Geb.mus     | <input checked="" type="checkbox"/> LV Lettland .....  | <input checked="" type="checkbox"/> TZ Vereinigte Republik Tansania      |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Deutschland + Gebrauchsmuster ..... | <input checked="" type="checkbox"/> MA Marokko .....   | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine .....                     |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Dänemark + Gebrauchsmuster .....    | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republik Moldau .....                                 | <input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda .....                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> DM Dominica .....                      | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagaskar .....                                      | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika .. |
| <input checked="" type="checkbox"/> DZ Algerien .....                      | <input checked="" type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien ..... | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Usbekistan .....                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> EC Ecuador .....                       | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolei .....  | <input checked="" type="checkbox"/> VN Vietnam .....                     |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estland + Gebrauchsmuster .....     | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi .....  | <input checked="" type="checkbox"/> YU Jugoslawien .....                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spanien .....                       | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexiko .....  | <input checked="" type="checkbox"/> ZA Südafrika .....                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finnland + Gebrauchsmuster .....    | <input checked="" type="checkbox"/> MZ Mosambik .....  | <input checked="" type="checkbox"/> ZM Sambia                            |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich              | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norwegen  | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Simbabwe .....                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> GD Grenada                             |  |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgien .....                      |  |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana .....                         |  |  |

Kästchen für die Bestimmung von Staaten, die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind.

- ☒ VC St. Vincent und die Grenadinen ☐ .....
- ☐ .....

**Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen:** Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der im Zusatzfeld genannten Bestimmungen, die von dieser Erklärung ausgenommen sind. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung (einschließlich der Gebühren) muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

**Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCH**

Die Priorität der folgenden früheren Anmeldung(en) wird hiermit in Anspruch genommen:

Anmeldedatum der früheren Anmeldung (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen der früheren Anmeldung	Ist die frühere Anmeldung eine:		
		nationale Anmeldung: Staat	regionale Anmeldung:* regionales Amt	internationale Anmeldung: Anmeldeamt
Zeile (1)				
Zeile (2)				
Zeile (3)				
Zeile (4)				
Zeile (5)				

☐ Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben.

Das Anmeldeamt wird ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem internationalen Büro zu übermitteln (nur falls die frühere Anmeldung(en) bei dem Amt eingereicht worden ist (sind), das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist):

☐ sämtliche Zeilen
 ☐ Zeile (1)
 ☐ Zeile (2)
 ☐ Zeile (3)
 ☐ Zeile (4)
 ☐ Zeile (5)
 ☐ weitere, siehe Zusatzfeld

\* Falls es sich bei der früheren Anmeldung um eine ARIPO-Anmeldung handelt, geben Sie mindestens einen Staat an, der Mitgliedstaat der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums oder Mitglied der Welthandelsorganisation ist und für den oder das die frühere Anmeldung eingereicht wurde: .....

**Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE**

Wahl der internationalen Recherchenbehörde (ISA) (falls zwei oder mehr als zwei internationale Recherchenbehörden für die Ausführung der internationalen Recherche zuständig sind, geben Sie die von Ihnen gewählte Behörde an; der Zweibuchstaben-Code kann benutzt werden):

ISA / .....

Antrag auf Nutzung der Ergebnisse einer früheren Recherche; Bezugnahme auf diese frühere Recherche (falls eine frühere Recherche bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist):

Datum (Tag/Monat/Jahr)                      Aktenzeichen                      Staat (oder regionales Amt)

**Feld Nr. VIII ERKLÄRUNGEN**

Die Felder Nr. VIII (i) bis (v) enthalten die folgenden Erklärungen (Kreuzen Sie unten die entsprechenden Kästchen an und geben Sie in der rechten Spalte für jede Erklärung deren Anzahl an):

Anzahl der  
Erklärungen

- |                          |                     |  |   |
|--------------------------|---------------------|--|---|
| <input type="checkbox"/> | Feld Nr. VIII (i)   | Erklärung hinsichtlich der Identität des Erfinders   | : |
| <input type="checkbox"/> | Feld Nr. VIII (ii)  | Erklärung hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, zum Zeitpunkt des internationalen Anmeldedatums, ein Patent zu beantragen und zu erhalten               | : |
| <input type="checkbox"/> | Feld Nr. VIII (iii) | Erklärung hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, zum Zeitpunkt des internationalen Anmeldedatums, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen | : |
| <input type="checkbox"/> | Feld Nr. VIII (iv)  | Erfindererklärung (nur im Hinblick auf die Bestimmung der Vereinigten Staaten von Amerika)   | : |
| <input type="checkbox"/> | Feld Nr. VIII (v)   | Erklärung hinsichtlich unschädlicher Offenbarungen oder Ausnahmen von der Neuheitsschädlichkeit  | : |

## Feld Nr. IX KONTROLLISTE; EINREICHUNGSSPRACHE

Diese internationale Anmeldung enthält:	Dieser internationalen Anmeldung liegen die folgenden Unterlagen bei (kreuzen Sie die entsprechenden Kästchen an und geben Sie in der rechten Spalte jeweils die Anzahl der beiliegenden Exemplare an)	Anzahl
(a) die folgende Anzahl an Blättern Papier:		
Antrag (inklusive Erklärungsblätter) :	1. <input type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung :	
Beschreibung (ohne Sequenzprotokollteil) :	2. <input checked="" type="checkbox"/> Original einer gesonderten Vollmacht :	5
Ansprüche :	3. <input type="checkbox"/> Original einer allgemeinen Vollmacht :	
Zusammenfassung :	4. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden): .....	
Zeichnungen :	5. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen einer Unterschrift :	
Teilanzahl :	6. <input type="checkbox"/> Prioritätsbeleg(e), in Feld Nr. VI durch folgende Zeilennummer(n) gekennzeichnet: .....	
Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Anzahl der Blätter, soweit auf Papier eingereicht wird, unabhängig davon, ob zusätzlich auch in computerlesbarer Form eingereicht wird) :	7. <input type="checkbox"/> Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache: .....	
Gesamtanzahl :	8. <input type="checkbox"/> Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen oder anderem biologischen Material :	
(b) Sequenzprotokollteil der Beschreibung in computerlesbarer Form eingereicht	9. <input type="checkbox"/> Sequenzprotokoll in computerlesbarer Form (geben Sie zusätzlich die Art und Anzahl der beiliegenden Datenträger an (Diskette, CD-ROM, CD-R oder sonstige)) :	
(i) <input type="checkbox"/> ausschließlich in dieser Form (nach Abschnitt 801(a)(i))	(i) <input type="checkbox"/> Kopie ausschließlich für die Zwecke der internationalen Recherche nach Regel 13ter (und nicht als Teil der internationalen Anmeldung) :	
(ii) <input type="checkbox"/> zusätzlich zur Einreichung auf Papier (nach Abschnitt 801(a)(ii))	(ii) <input type="checkbox"/> (nur falls Feld (b)(i) oder (b)(ii) in der linken Spalte angekreuzt wurde) zusätzliche Kopien einschließlich, soweit zutreffend, einer Kopie für die Zwecke der internationalen Recherche nach Regel 13ter :	
Art und Anzahl der Datenträger (Diskette, CD-ROM, CD-R oder sonstige), auf denen der Sequenzprotokollteil enthalten ist (zusätzlich eingereichte Kopien unter Punkt 9(ii) in der rechten Spalte angeben): .....	(iii) <input type="checkbox"/> zusammen mit entsprechender Erklärung, daß die Kopie(n) mit dem in der linken Spalte aufgeführten Sequenzprotokollteil identisch ist (sind) :	
	10. <input checked="" type="checkbox"/> Sonstige (einzeln auflisten): Untervollmacht .....	1
Abbildung der Zeichnungen, die mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden soll (Nr.):	Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wird: Deutsch	

## Feld Nr. X UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS, DES ANWALTS ODER DES GEMEINSAMEN VERTRETERS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.



André Braun

4. Oktober 2002 / bc

Vom Anmeldeamt auszufüllen		2. Zeichnungen: <input type="checkbox"/> eingegangen:  <input type="checkbox"/> nicht eingegangen:
1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:	04. Okt. 2002 (04. 10. 02)	
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:		
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:		
5. Internationale Recherchenbehörde (falls zwei oder mehr zuständig sind): ISA /	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben	

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:

## 5 Neue Substrate für TAFIa

TAFI (thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor) ist ein der Carboxypeptidase B ähnliches Proenzym von 55 kDa, welches durch Proteolyse am Arg-92 zum Enzym TAFIa (35 kDa) aktiviert wird. Im Unterschied zur Carboxypeptidase B, welche als Proenzym von 46 kDa durch Proteolyse am Arg-95 aktiviert wird und im Magen und Verdauungstrakt wirkt, ist TAFIa ein Leberenzym, das seine Wirksamkeit im Blut entfaltet.

TAFIa wird durch Thrombin und wahrscheinlich auch Plasmin aus TAFI gebildet und ist ein wichtiger Inhibitor der Fibrinolyse. Die Aktivierung von TAFI wird durch die Bindung von Thrombin an Thrombomodulin ungefähr 1250-fach verstärkt. Die inhibierende Wirkung von TAFIa beruht auf der Fähigkeit, Carboxy-terminale Arginine und Lysine abzuspalten, wobei die Spezifität gegenüber Arginin grösser ist.

TAFIa selbst ist gegenüber Proteolysen sehr empfindlich und bereits bei 37°C instabil.

Fibrinolyse beginnt, wenn Plasminogen durch tPA in Plasmin umgewandelt wird. Plasmin baut dann das Fibringerinnsel zu löslichen Fibrin-Produkten ab, die ihrerseits zu einer zusätzlichen Stimulierung der Plasminbildung beitragen. TAFIa spaltet die Carboxy-terminalen Lysine dieser Fibrin Produkte ab, was zu einer Verhinderung der Bildung des tPA/Plasminogen/Fibrin-Komplexes führt, womit die Fibrinolyse gehemmt wird.

Die Messung der TAFIa-Konzentration im Plasma gibt einen wichtigen Hinweis zum Blutungs- resp. Thromboserisiko von Patienten.

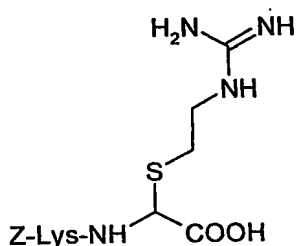
Eine Bestimmung von Carboxypeptidasen ist möglich mit immunologischen Tests, wie z.B. ELISA, welche aber nicht die Aktivität von TAFI erfassen. Funktionelle Tests sind beschrieben, worin TAFIa auf synthetische Substrate des Typs R-Arg-COOH oder R-

- 2 -

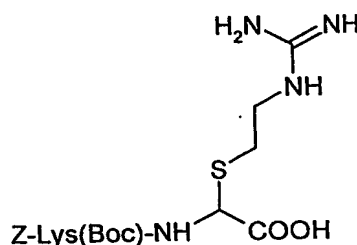
Lys-COOH einwirkt und dabei 'R' (z.B. Hippuryl) freisetzt, welches mittels HPLC oder spektrophotometrisch im nahem UV-Bereich gemessen werden kann.

Es gibt bisher erst einen chromogenen Assay für die Messung von TAFI und TAFIa im Plasma auf Mikrotiterplatten. Die Farbstoffbildung ist jedoch zu kompliziert (mehrstufig) und verläuft unbefriedigend. Da die Absorptionsmessung bei 490 nm vorgenommen wird, eignet er sich – wie auch die vorgängig beschriebenen Methoden – nicht für die Messung auf gängigen Automaten, in denen die Extinktionsänderungen bei 405 nm erfolgen.

Die Thiaarginin-Derivate der folgenden Formeln A und B



A

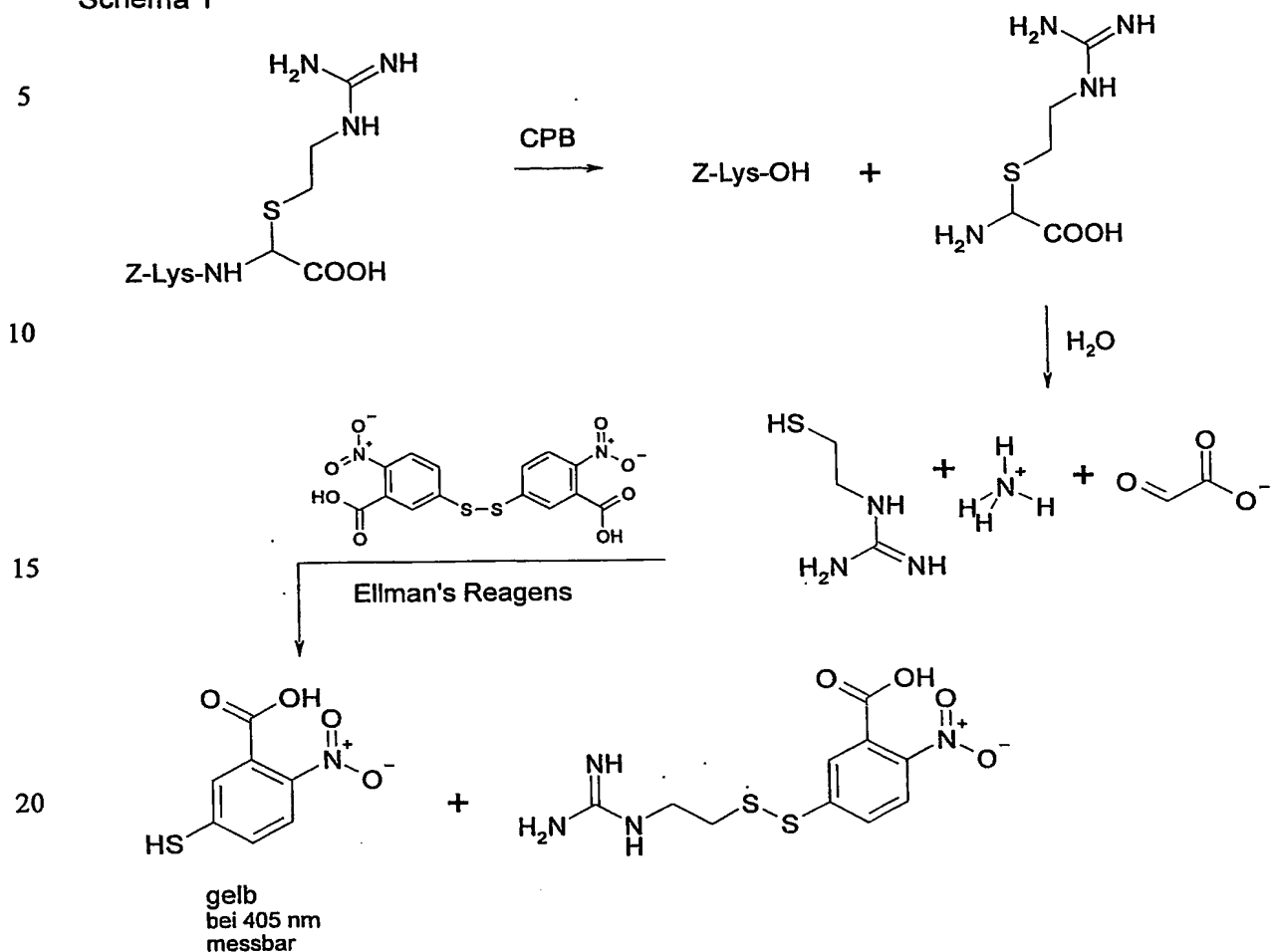


B

sind als Substrate für Carboxypeptidase B beschrieben worden (Bull. Korean. Chem. Soc. 1998, 19(2), 189-193). Diese Verbindungen zeigen bemerkenswerte Spaltungsraten durch Carboxypeptidase B (CPB), andererseits werden sie durch TAFIa kaum gespalten. Der Nachweis von CPB mittels Verbindung A erfolgt gemäss dem nachfolgenden Schema 1.



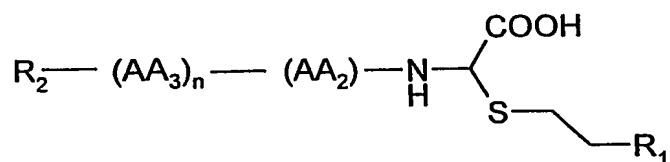
Schema 1



25 Überraschenderweise lässt sich diese Selektivität bereits durch kleine Strukturvariationen zu Gunsten von TAFIa umkehren.

Die vorliegende Erfindung betrifft neue TAFIa-Substrate der allgemeinen Formel I

30



worin

$R_1$  eine Gruppe  $\text{CH}_2\text{NH}_2$  oder  $\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$  bedeutet,

- 4 -

AA<sub>2</sub> jeweils unsubstituiertes oder substituiertes Lysin, Ornithin, Arginin oder Histidin bedeutet, wobei die Substituenten übliche Schutzgruppen sind,

AA<sub>3</sub> eine natürliche Aminosäure bedeutet, bei der eine allenfalls vorhandene schütz-  
bare Gruppe in der Seitenkette durch eine übliche Schutzgruppe

5 substituiert sein kann,

n 0 oder 1 ist, und

R<sub>2</sub> eine Gruppe Bz, Bzl, Ac, Boc, Z, Suc, MeoSuc oder Tos bedeutet,

mit der Massgabe, dass nicht gleichzeitig n 0 ist und R<sub>2</sub> Z und (AA<sub>2</sub>) unsubstituiertes  
oder durch Boc substituiertes Lysin bedeuten,

10 und deren Salze mit Mineralsäuren oder organischen Säuren.

R<sub>1</sub> bedeutet vorzugsweise NHC(NH)NH<sub>2</sub>.

Zweckmässigerweise ist n 1. Wenn n 0 ist, dann ist zweckmässigerweise (AA<sub>2</sub>)

15 unsubstituiertes oder substituiertes Ornithin, Arginin oder Histidin und/oder R<sub>1</sub> ist  
zweckmässigerweise CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>.

Bevorzugte Bedeutungsmöglichkeiten für AA<sub>2</sub> sind z.B. Lys(ε-Z), Lys(ε-Boc), Lys(ε-Ac),  
Lys(ε-Bz), Lys(ε-Bzl), Lys(ε-Tos), Orn(δ-Z), Orn(δ-Boc), Orn(δ-2-chlor-Z), Orn(δ-Dnp),

20 Orn(δ-Z), Orn(δ-Aloc), Arg(ω-Pbf), Arg(δ,ω-Boc)<sub>2</sub>, Arg(δ,ω-Z)<sub>2</sub>, Arg(ω-Tos), His(N<sup>im</sup>-  
Boc), His(N<sup>im</sup>-Ac), His(N<sup>im</sup>-Bz), His(N<sup>im</sup>-Bzl) oder His(N<sup>im</sup>-Tos), wobei Lys(ε-Z)  
besonders bevorzugt ist.

Als Schutzgruppen in der Aminosäure AA<sub>3</sub> kommen z.B. tBu, Bzl oder Ac in Betracht,  
25 wobei Phenylalanin, Alanin, Serin und Valin bevorzugte Aminosäuren sind.

R<sub>2</sub> bedeutet vorzugsweise Bz.

Als Salze kommen z.B. Hydrobromide, Hydrochloride, Trifluoracetate oder Acetate in  
30 Betracht, wobei Acetat- Trifluoracetat- und Hydrochlorid-Salze bevorzugt sind,

Die oben verwendeten Abkürzungen für Schutzgruppen sowie eine Reihe weiterer  
Abkürzungen werden in einer zwischen Beispielen 2 und 3 eingefügten Tabelle  
erläutert.

Die Verbindungen der allgemeinen Formel I, welche bezüglich dem mit dem Schwefelhaltigen Substituenten versehenen asymmetrischen Kohlenstoff als Racemate oder in einer ihrer enantiomerenreinen Formen D und L vorliegen können, lassen sich nach den nachfolgend beschriebenen, an sich bekannten Methoden herstellen.

5

Geschützte Aminosäuren oder geschützte Oligopeptidderivate werden in die entsprechenden Säureamide übergeführt, und diese werden analog zu den von Hong, N.J. et al, Bull. Korean Chem. Soc. 1998, 19(2), 189-193 beschriebenen Verfahren mit einem Alkylester der Glyoxylsäure, zweckmässigerweise einem C<sub>1-8</sub>-Alkylester, wie  
10 Glyoxylsäureethylester, unter Rückfluss kondensiert. Die dabei entstandenen Hydroxyglycinderivate werden O-acetyliert und mit einer entsprechenden Mercaptoalkylverbindung, wie Cysteamin, 3-Mercaptopropylamin oder S-2-Aminoethylisothiuroniumbromid, substituiert. Die erhaltenen Alkylester der Verbindungen der Formel I werden dann zu den entsprechenden freien Säuren  
15 alkalisch verseift.

20

Die Verbindungen der Formel I und ihre Säureadditionssalze eignen sich als Substrate für die Bestimmung von TAFIa. Diese Bestimmung kann erfindungsgemäss dadurch durchgeführt werden, dass man TAFIa in Gegenwart von 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure), unter der Bezeichnung "Ellman's Reagens" bekannt, auf eine  
Verbindung gemäss einem der Ansprüche 1 bis 7 einwirken lässt und die dabei durch die Bildung von 3-Carboxy-4-nitrothiophenol entstehende Absorption zwischen 400 und 412 nm in Abhängigkeit von der Zeit photospektrometisch ermittelt. Die erwähnte  
Einwirkung erfolgt zweckmässigerweise bei etwa 10°C bis 37°C, vorzugsweise bei  
25 Raumtemperatur, und die Einwirkungszeit kann etwa 5 bis 15 Minuten, vorzugsweise etwa 10 Minuten, betragen. Als Quelle für TAFIa kann das im Blutplasma vorhandene TAFI verwendet werden.

30

Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung näher illustrieren ohne ihren Umfang einzuschränken.

35

Die Identifizierung und Charakterisierung der gemäss Beispielen 1 und 2 erhaltenen Eluate und Produkte wurde mittels Proton-NMR, HPLC-Elektrospray-MS und/oder Elementaranalyse ausgeführt.

Beispiel 1:

Herstellung von Benzoyl-(L)-lysyl-(ε-benzyloxycarbonyl)-α-(D,L)-(2-guanidinoethylthio)-glycine Hydrochloridsalz [Bz-(L)-Lys(Z)-(D,L)-Arg(GUS)-OH • HCl]

5

1A) Benzoyl-(L)-lysyl-(ε-benzyloxycarbonyl)-α-(D,L)-hydroxyglycine-ethylester  
[Bz-(L)-Lys(Z)-(D,L)-Gly(α-OH)-OEt]

5.0 g (13 mmol) Benzoyl-(L)-lysinamid und eine 50%-ige Toluollösung von 13.3 g (65 mmol) Glyoxylsäureethylester wurden in 100ml THF rückfliessend erhitzt. Nach 4h wurde die Lösung auf RT abgekühlt und direkt in den Reaktionsschritt 1B) überführt.

10

1B) Benzoyl-(L)-lysyl-(ε-benzyloxycarbonyl)-α-(D,L)-acetoxglycine-ethylester  
[Bz-(L)-Lys(Z)-(D,L)-Gly(α-OAc)-OEt]

Die Reaktionslösung aus 1A) wurde mit 127 mg (1 mmol) DMAP, 24.7 ml (0.31 mol) Pyridin und 40 g (0.39 mol) Essigsäureanhydrid versetzt und bei RT während 90 Min. gerührt. Die Reaktionslösung wurde über Kieselgel filtriert, das Lösungsmittel abdestilliert und das erhaltene Rohprodukt im Vakuumtrockenschrank getrocknet. Ausbeute: 14 g.

15

1C) Benzoyl-(L)-lysyl-(ε-benzyloxycarbonyl)-α-(D,L)-(2-guanidinoethylthio)-glycine ethylester Trifluoressigsäuresalz [Bz-(L)-Lys(Z)-(D,L)-Gly(α-GUS)-OEt • TFA]

20

5.5 g (19.5 mmol) S-(2-Aminoethyl)isothiuroniumbromid hydrobromid und 4 g (39 mmol) TEA wurden in 50 ml DMF gelöst und während 5 Min. bei RT gerührt. Dann wurde eine Lösung von 14 g des unter 1B) erhaltenen Produktes in 30 ml DMF zugegeben. Nach 2 h Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel am Rotovapor abdestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels LH20 (Methanol) chromatographiert. Die reinen, eingedampften Fraktionen wurden in wenig Methanol aufgenommen und das Produkt mittels Zugabe von BME als nahezu weisses, amorphes Pulver ausgefällt.

25

ESI-MS [M+H]<sup>+</sup>– 587

30

1D) Benzoyl-(L)-lysyl-(ε-benzyloxycarbonyl)-α-(D,L)-(2-guanidinoethylthio)-glycine  
[Bz-(L)-Lys(Z)-(D,L)-Gly(α-GUS)-OH]

3.1 g (4.4 mmol) der Verbindung 1C) wurden in 20 ml Ethanol gelöst, mit 11 ml NaOH (1N) versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Nach Einstellen des pH's auf 3 mit Zitronensäure und Abdestillieren des Lösungsmittels wurde der Rückstand mittels

35

- 7 -

LH20 (Methanol) chromatographiert. Zur Überführung in das Hydrochloridsalz wurden die reinen, eingeeengten Fraktionen in 100 ml eines Methanol/Wasser-Gemisches (1:1) gelöst und über Amberlite (Cl<sup>-</sup> Form) chromatographiert. Die erhaltene Lösung wurde am Rotovapor eingeeengt, und das Produkt fällt als gelbliches Öl an.

5 Ausbeute: 2.5 g, ESI-MS [M+H]<sup>+</sup> – 559

Beispiel 2:

Herstellung von Benzoyl-(L)-lysyl-(ε-benzyloxycarbonyl)-α-(D,L)-(3-aminopropylthio)-glycine Trifluoressigsäuresalz [Bz-(L)-Lys(Z)-(D,L)-Gly(α-SPrA)-OH • TFA]

10

2C) Benzoyl-(L)-lysyl-(ε-benzyloxycarbonyl)-α-(D,L)-(3-aminopropylthio)-glycine ethylester Trifluoressigsäuresalz [Bz-(L)-Lys(Z)-(D,L)-Gly(α-SPrA)-OEt • TFA]

15

2.5 g (20 mmol) 3-Mercaptopropylamine hydrochlorid und 2 g (20 mmol) TEA wurden in 40 ml DMF gelöst, die Lösung während 5 min bei RT gerührt und mit einer Lösung von 6.9 g des unter 1B) erhaltenen Produktes in 30 ml DMF versetzt. Nach 2-stündigem Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel am Rotovapor abdestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC chromatographiert. (ACN/H<sub>2</sub>O/TFA). Die reinen Fraktionen wurden am Rotovapor eingeeengt.

20

ESI-MS [M+H]<sup>+</sup> – 559

2D) Benzoyl-(L)-lysyl-(ε-benzyloxycarbonyl)-α-(D,L)-(3-aminopropylthio)-glycine Trifluoressigsäuresalz [Bz-(L)-Lys(Z)-(D,L)-Gly(α-SPrA)-OH • TFA]

25

0.43 g (0.6 mmol) der Verbindung 2C) wurden in 7 ml Ethanol gelöst, mit 2 ml NaOH (1N) versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 10%-iger Zitronensäure auf pH 3 gestellt, 3 mal mit je 20 ml Ethylacetat extrahiert und mit ges. NaCl-Lösung 2 mal gewaschen. Die organische Phase wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotovapor abdestilliert. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC chromatographiert (ACN/H<sub>2</sub>O/TFA). Die reinen Fraktionen wurden am Rotovapor eingeeengt und der Rückstand in wenig Methanol gelöst und durch Zugabe von BME ausgefällt. Das nahezu weisse Pulver wurde abfiltriert, mit wenig BME gewaschen und im Vakuumtrockenschrank getrocknet.

30

ESI-MS [M+H]<sup>+</sup> – 531

Abkürzungen

Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril
Aloc	Allyloxycarbonyl
BME	t-Butyl methyl ether
Boc	t-Butyloxycarbonyl
Bz	Benzoyl
Bzl	Benzyl
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	N,N-Dimethylformamid
Dnp	2,4-Dinitrophenyl
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
EtOAc	Ethylacetat
GUS	2-Guanidino-ethylthio
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
LH20	Sephadex
MeoSuc	Methoxysuccinyl
NAPAP	N $\alpha$ -(2-naphthylsulfonyl-glycyl)-4-amidinophenylalanine-piperidide
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyl-dibenzohydrofuran-5-sulfonyl
RT	Raumtemperatur
Suc	Succinyl
tBu	tert.-Butyl
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Tos	Tosyl
Z	Benzyloxycarbonyl

5 Beispiel 3:Quantitative Bestimmung von TAFIa

Prinzip: TAFIa wird analog zu Schema 1 bestimmt. In einem ersten Schritt wird das Substrat von TAFIa in der Weise hydrolysiert, dass eine Thioamino-säure (Thiaarginin

oder Thialysin) freigesetzt wird. Diese instabilen Zwischenprodukte werden rasch zu 2-Mercaptoethylguanidin resp. 3-Mercaptopropylamin abgebaut. Diese Mercaptoverbindungen reagieren mit dem Ellman's Reagens (5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)) und setzen dabei das intensive gelbe 3-Carboxy-4-nitrothiophenol frei, welches photospektrometrisch bei 405-412 nm gemessen werden kann. Der gemessene Gehalt an freiem Thiol ist direkt proportional zur Menge des durch TAFIa hydrolisierten Substrats und ermöglicht damit eine quantitative Analyse der Enzym-Aktivität.

- 10 Enzym-Assay: Die Messung der Enzymaktivität wird unter Verwendung einer Substrat Stammlösung von 10 mM in DMSO bei Raumtemperatur durchgeführt. TAFI menschlichen Ursprungs ist in einer Stammlösung von 360 µg/ml bei Enzyme Research Laboratory oder über Blutplasma erhältlich. Die Aktivierung von TAFI zu TAFIa wurde mittels Thrombin (2.7U/ml), dessen Aktivierung mit 30 µg Thrombomodulin erfolgte, vorgenommen. Überschüssige Thrombinaktivität wurde durch Zugabe des synthetischen Inhibitors NAPAP eliminiert. Die Messung wurde auf Mikrotiterplatten durchgeführt.
- 15 Die Zunahme der Absorption bei 405-412 nm wurde während 10 Minuten aufgezeichnet.

20

Aktivierung:

TAFI 20 µl

Thrombin (2,7 E/ml) 20 µl

Thrombomodulin (30 µg/ml) 20 µl

- 25 in Puffer (20 mM HEPES, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,01 % Tween 80; pH 7,4)

5 min bei 25 °C inkubieren

Messung:Puffer (20 mM HEPES, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,01 % Tween 80; pH 7,4) 120 µl

- 30 NAPAP (100 µM) 20 µl

DTNB (5 mM) 10 µl

Substrat (10 mM) 20 µl

bei RT 10 min messen

35

Resultate:

- Spaltung von Thiaarginin- und Thialysinsubstraten (Endkonzentration 174  $\mu$ M)  
durch TAFIa (Endkonzentration 17  $\mu$ g/ml)

- 5 - in Klammern die Werte für Carboxypeptidase B  
- Vergleichssubstanzen A und B aus „Bull. Korean.  
Chem. Soc. 1998, 19(2), 189-193“  
-  $\Delta E$  = Änderung der Extinktion bei 405 nm

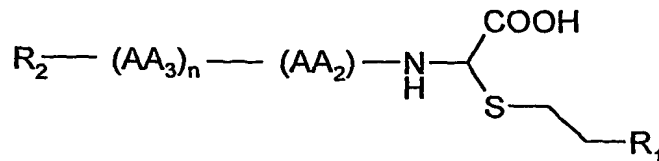
10 Tabelle 1

Nr.	Substrate	$\Delta E/\text{min}$
4269	Bz-K(Z)-G(GUS)-OH x HCl	0,108 (0,018)
4273	Boc-K(Tos)-G(GUS)-OH x HCl	0,014 (0,048)
4275	Boc-K(Z)-G(GUS)-OH x TFA	0,041 (0,028)
4298	Boc-F-K(Boc)-G(GUS)-OH x HCl	0,043 (0,034)
4300	Bz-P-K(Boc)-G(GUS)-OH x TFA	0,012 (0,072)
4302	Z-A-K(Boc)-G(GUS)-OH x HCl	0,042 (0,059)
4334	Bz-V-G(GUS)-OH x TFA	0,034
4336	Bz-V-G( $\alpha$ -SPrA)-OH x TFA	0,053
4339	Bz-K(Z)-G( $\alpha$ -SPrA)-OH x TFA	0,055
4341	Boc-K(Z)-G( $\alpha$ -SPrA)-OH x TFA	0,054
	Vergleichssubstanz A x HCl	0,002 (0,062)
	Vergleichssubstanz B x HCl	0,016 (0,077)



# **Patentansprüche**

1. Verbindungen der allgemeinen Formel I



worin

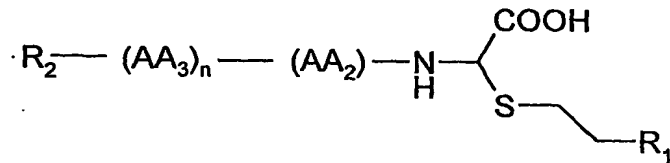
- $R_1$  eine Gruppe  $\text{CH}_2\text{NH}_2$  oder  $\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$  bedeutet,  
 $AA_2$  jeweils unsubstituiertes oder substituiertes Lysin, Ornithin, Arginin oder  
 10 Histidin bedeutet, wobei die Substituenten übliche Schutzgruppen sind,  
 $AA_3$  eine natürliche Aminosäure bedeutet, bei der eine allenfalls vorhandene  
 schützbbare Gruppe in der Seitenkette durch eine übliche Schutzgruppe  
 substituiert sein kann,  
 $n$  0 oder 1 ist, und  
 15  $R_2$  eine Gruppe Bz, Bzl, Ac, Boc, Z, Suc, MeoSuc oder Tos bedeutet,  
 mit der Massgabe, dass nicht gleichzeitig  $n$  0 ist und  $R_2$  Z und  $(AA_2)$  unsubstituiertes  
 oder durch Boc substituiertes Lysin bedeuten,  
 und deren Salze mit Mineralsäuren oder organischen Säuren.
- 20 2. Verbindungen gemäss Anspruch 1, worin  $AA_2$  Lys( $\epsilon$ -Z), Lys( $\epsilon$ -Boc), Lys( $\epsilon$ -Ac),  
 Lys( $\epsilon$ -Bz), Lys( $\epsilon$ -Bzl), Lys( $\epsilon$ -Tos), Orn( $\delta$ -Z), Orn( $\delta$ -Boc), Orn( $\delta$ -2-chlor-Z), Orn( $\delta$ -Dnp),  
 Orn( $\delta$ -Z), Orn( $\delta$ -Aloc), Arg( $\omega$ -Pbf), Arg( $\delta,\omega$ -Boc)<sub>2</sub>, Arg( $\delta,\omega$ -Z)<sub>2</sub>, Arg( $\omega$ -Tos), His( $\text{N}^{\text{im}}$ -  
 Boc), His( $\text{N}^{\text{im}}$ -Ac), His( $\text{N}^{\text{im}}$ -Bz), His( $\text{N}^{\text{im}}$ -Bzl) oder His( $\text{N}^{\text{im}}$ -Tos) bedeutet, wobei Lys( $\epsilon$ -Z)  
 bevorzugt ist
- 25 3. Verbindungen gemäss Anspruch 1 oder 2, worin  $AA_3$  Ala, Ser, Phe, Val, Ile,  
 Leu, Thr, Pro, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys, Met, Trp, Tyr oder Gly bedeuten,  
 wobei eine allenfalls vorhandene schützbbare Gruppe in der Seitenkette durch eine  
 übliche Schutzgruppe, wie tBu, Bzl oder Ac substituiert sein kann.
- 30 4. Verbindungen gemäss Anspruch 3, worin  $AA_3$  Phe, Ala, Val oder  
 gegebenenfalls durch tBu, Bzl oder Ac geschütztes Ser bedeutet.

5. Verbindungen gemäss Anspruch 1, worin  
R<sub>1</sub> NHC(NH)NH<sub>2</sub>,  
AA<sub>2</sub> Val, Lys(ε-Z) oder Lys(ε-Boc),  
AA<sub>3</sub> Ala, Ser, Phe, Val, Ser(tBu), Ser(Bzl) oder Ser(Ac),  
5 n 0 oder 1 und  
R<sub>2</sub> Bz, Boc oder Z bedeuten.
6. Verbindungen gemäss Anspruch 1, worin  
R<sub>1</sub> CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>,  
10 AA<sub>2</sub> Val, Lys(ε-Z) oder Lys(ε-Boc),  
AA<sub>3</sub> Ala, Ser, Phe, Val, Ser(tBu), Ser(Bzl) oder Ser(Ac),  
n 0 oder 1 und  
R<sub>2</sub> Bz, Boc oder Z bedeuten.
- 15 7. Verbindungen gemäss einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet,  
dass diese als Säureadditionssalze in Form von Hydrobromiden, Hydrochloriden,  
Trifluoracetaten oder Acetaten vorliegen.
8. Verwendung der Verbindungen gemäss einem der Ansprüche 1 bis 7 als  
20 Substrate für die Bestimmung von TAFIa.
9. Verfahren zur Bestimmung von TAFIa, dadurch gekennzeichnet, dass man  
TAFIa in Gegenwart von 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) auf eine Verbindung  
gemäss einem der Ansprüche 1 bis 7 einwirken lässt und die dabei durch die Bildung  
25 von 3-Carboxy-4-nitrothiophenol entstehende Absorption zwischen 400 und 412 nm in  
Abhängigkeit von der Zeit photospektrometisch ermittelt.
10. Verfahren gemäss Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Einwirkung  
während 5 bis 15 Minuten, insbesondere während 10 Minuten bei einer Temperatur  
30 von 10°C bis 37°C, insbesondere bei Raumtemperatur erfolgt.
11. Verfahren gemäss Anspruch 9 oder 10 dadurch gekennzeichnet, dass als  
Quelle für TAFIa das im Blutplasma vorhandene TAFI verwendet wird.
- 35 12. Verfahren zur Herstellung der in Anspruch 1 definierten Formel I, dadurch  
gekennzeichnet, dass man einen entsprechenden Alkylester alkalisch verseift.

## Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung beschreibt Verbindungen der allgemeinen Formel I

5



und Säureadditionssalze davon, worin die verschiedenen Symbole die in der Beschreibung und den Ansprüchen definierten Bedeutungen haben, deren Herstellung und deren Verwendung als Substrate zum Nachweis von TAFIa, einem die Fibrinolyse hemmenden Enzym. Der Nachweis erfolgt photospektrometrisch, indem die durch die Bildung von 3-Carboxy-4-nitrothiophenol aus dem Ellman's Reagens entstehende Absorption zwischen 400 und 412 nm in Abhängigkeit von der Zeit gemessen wird.

10